



A TPPP/p25 és drog molekulák szerepe a mikrotubulusok sokrétű funkcióinak szabályozásában

A doktori értekezés tézisei

Tőkési Natália

**Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola (vezetője: Dr. Erdei Anna)
Szerkezeti Biokémia Program (vezetője: Dr. Gráf László)**

**Témavezető: Dr. Ovádi Judit
tudományos tanácsadó**

**Dr. Gráf László
professzor**

**Magyar Tudományos Akadémia
Enzimológiai Intézet
Budapest, 2011**

Hlavanda E, Klement E, Kokai E, Kovács J, Vincze O, **Tőkési N**, Orosz F, Medzihradszky K.F, Dombrádi V, Ovádi J.

Phosphorylation blocks the activity of tubulin polymerization promoting protein (TPPP)
J Biol Chem. 2007 Oct 5;282(40):29531-9.

Németh L. A, Medveczky P, Tóth E, Siklósi E, Schlett K, Patthy A, Palkovits M, Ovádi J, **Tőkési N**, Németh P, Szilágyi L, Gráf L.

Unconventional translation initiation of human trypsinogen 4 at a CUG codon with an N terminal leucine
FEBS J. 2007 Mar 274(6):1610-20.

Vincze O, **Tőkési N**, Oláh J, Hlavanda E, Zotter A, Horváth I, Lehotzky A, Tirián L, Medzihradszky K F, Kovács J, Orosz F, Ovádi J

Tubulin Polymerization Promoting Proteins (TPPPs): Members of a New Family with Distinct Structures and Functions
Biochemistry. 2006 Nov 21;45(46):13818-26.

Oláh J, **Tőkési N**, Vincze O, Horváth I, Lehotzky A, Erdei A, Szájli E, Medzihradszky F. K, Orosz F, Kovács G. G, Ovádi J.

Interaction of TPPP/p25 protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and their co-localization in Lewy bodies
FEBS Lett. 2006 Oct 30;580(25):5807-14.

BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtek egyik fő vázrendszerét alkotó mikrotubulusok fontos szerepet töltenek be a sejt alakjának fenntartásában és kialakításában, a sejt osztódásában és a sejtek mozgásában.

A mikrotubulusok dinamikája és organizációja elengedhetetlenül fontos biológiai funkcióinak betöltéséhez. E tulajdonságuknak köszönhetően tudnak a mikrotubulusok gyorsan átépülni, differenciálódni térben és időben a sejtek környezetének és igényeinek megfelelően és létrehozni olyan különböző struktúrákat, mint például az interfázisos mikrotubulusok és az osztódási orsók.

A mikrotubulusok dinamikáját és organizációját számos fehérje szabályozza. Ilyen szabályozó fehérjék például a mikrotubulusok polimerizációját elősegítő faktorok, a mikrotubulus stabilizáló faktorok (mint pl. a szerkezeti mikrotubulushoz asszociált proteinek (MAP-ek), mikrotubulus destabilizáló faktorok, a mikrotubulus daraboló fehérjék és végül a mikrotubulusokon működő dynein és kinezin motorfehérje családok.

A tubulin polimerizációját promotáló proteint (TPPP/p25) munkacsoportunk azonosította, mint egy új MAP-et, mely elősegíti a tubulin polimerizációját mikrotubulusokká és indukálja azok kötegelését *in vitro* rendszerekben. HeLa sejtekben az exogén fehérje dinamikusan és specifikusan a mikrotubulusokon lokalizálódik és indukálja azok kötegekbe rendezését. *In vivo*, normál agyszövetben a fehérje az oligodendrocitákban fordul elő, szerepe egyelőre azonban még nem tisztázott. Patológias esetben a fehérje felhalmozódása mutatható ki különböző a Parkinson kórra, Multiszipisztémás Atrophiára és más szinukleinopátiákra jellemző zárványtestekben.

A szabályozó fehérjék mellett számos molekula létezik, mely a mikrotubulusok dinamikáját és organizációját befolyásolja. Ezen molekulák egy fontos csoportját alkotják a bisindolok, melyek eredményesen gátolják a rákos sejtek osztódását, így mellékhatásaik ellenére széles körben alkalmazzák a rákgyógyászatban. Mindazonáltal, új, kisebb mellékhatással bíró drog molekulák kifejlesztése igen fontos feladat a gyógyszerkutatók számára.

Két ilyen új bisindol származék a KAR-2 és a 17-dezacetilvinblasztinTrp-Arg8, melyet Dr. Keve és Ács (Richter-Gedeon Nyrt.), illetve Prof. Hudecz (Eötvös Loránd Tudományegyetem) hozott létre. Munkacsoportunk jellemezte a KAR-2 tulajdonságait atomi és molekuláris szinten. A KAR-2 kémiai szerkezete, a vinblasztin vindolin részén kialakuló spirogyűrűben tér el anyamolekulájától, a vinblasztintól. A 17-dezacetilvinblasztinTrp-Arg8

molekula egy oktaarginin, a sejtmembránon való átjutást segítő szakasz, 17-dezacetilvinblastinTrp-hoz történő kapcsolásával jött létre. A vinblasztinnál jelentősen kisebb mellékhatásai a KAR-2-nek állatkísérletekben, illetve a 17-dezacetilvinblasztinTrp-Arg8 nagyobb hatásfoka drog rezisztens humán leukémia sejteken azt sugallja, hogy mindkét molekula ígéretes rákgyógyszer lehet.

CÉLKITŰZÉS

Doktori munkám célja a mikrotubuláris váz organizációjának és dinamikájának jellemzése a TPPP/p25-tel és a két új drog molekulával való kölcsönhatásai során annak érdekében, hogy egyrészt azonosítsunk olyan TPPP/p25 irányította sejt szintű folyamatokat melyek jelzik a TPPP/p25 fiziológiás funkcióját; másrészt, hogy meghatározzuk a drogok anti-mikrotubuláris és antimitotikus hatását és ezzel hozzájáruljunk hatékonyabb és kisebb mellékhatással bíró rákellenes szerek kifejlesztéséhez.

MÓDSZEREK

Tubulin, mikrotubulus és TPPP/p25 preparálás
Turbidimetria
Felületi plazmon rezonancia mérés
Enzim aktivitásmérés
Rekombináns technikák
RNS interferencia
Western-blot
Sejtenyésztés és differenciáció
Sejtek tranziens transzfekciója fluoreszcens fúziós fehérjékkel
Stabil sejtvonal előállítása, klónszelekció
Immunitokémia
Fázis kontraszt-, epifluoreszcens-, konfokális- és video-mikroszkópia
Mikroszkópos képanalízis

PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Bánóczi Z, Gorka-Kereskényi Á, Reményi J, Orbán E, Hazai L, **Tőkési N**, Oláh J, Ovádi J, Béni Z, Háda V, Szántay C Jr, Hudecz F, Kalaus G, Szántay C.
Synthesis and in vitro antitumor effect of vinblastine derivative-oligoarginine conjugates.
Bioconjug Chem. 2010 Nov 17;21(11):1948-55.

Tőkési N, Lehotzky A, Horváth I, Szabó B, Oláh J, Lau P, Ovádi J.
TPPP/p25 promotes tubulin acetylation by inhibiting histone deacetylase 6.
J Biol Chem. 2010 Jun 4;285(23):17896-906.

Lehotzky A, Lau P, **Tőkési N**, Muja N, Hudson LD, Ovádi J.
Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25) is critical for oligodendrocyte differentiation.
Glia. 2010 Jan 15;58(2):157-68.

Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez M, Oltra-Noguera D, Merino V, **Tőkési N**, Ovádi J, Bermejo M.
Unique pharmacology of KAR-2, a potential anti-cancer agent: absorption modelling and selective mitotic spindle targeting.
Eur J Pharm Sci. 2009 Jan 31;36(1):11-9.

Lehotzky A, **Tőkési N**, Gonzalez-Alvarez I, Merino V, Bermejo M, Orosz F, Lau P, Kovács GG, Ovádi J.
Progress in the development of early diagnosis and a drug with unique pharmacology to improve cancer therapy.
Philos Transact A Math Phys Eng Sci. 2008 Oct 13;366(1880):3599-617.

Lehotzky A., Tirián L., **Tőkési N.**, Lenárt P., Szabó B., Kovács J. and Ovádi J.
Dynamic targeting of microtubules by TPPP/p25 affects cell survival
J Cell Sci. 2004 Dec 1;117(Pt 25):6249-59.

A dolgozat tárgyát nem képző közlemények:

Oláh J, Vincze O, Virók D, Simon D, Bozso Z, **Tőkési N**, Horváth I, Hlavanda E, Kovács J, Magyar A, Szűcs M, Orosz F, Penke B, Ovádi J.
Interactions of pathological hallmark proteins: Tubulin polymerization promoting protein/p25, {beta}-amyloid and {alpha}-synuclein.
J Biol Chem. 2011 Sep 30;286(39):34088-100.

10.) Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat elvégeztük a 17-dezacetilvinblasztinTrp-Arg₈ szintézise során keletkezett két epimer molekulával is, a 17-dezacetilvinblasztinTrp-Arg₈-1-el és -2-vel. Megállapítottam, hogy a 17-dezacetilvinblasztinTrp-Arg₈-2 anti-mikrotubuláris aktivitása megegyezik mind a vinblasztinével, mind a 17-dezacetilvinblasztineTrp-éval, ugyanakkor, a 17-dezacetilvinblasztinTrp-Arg₈-1 kevésbé gátolta a tubulin polimerizációját. Az interfázisos és a osztódási orsók mikrotubulusainak immunofluoreszcens mikroszkópos analízise humán méhnyakrák eredetű (HeLa) sejtek drogokkal történt kezelése után azt mutatta, hogy a 17-dezacetilvinblasztinTrp-Arg₈-1 epimer konjugátum bizonyos körülmények között, a mitózis metafázisában aberráns osztódási orsók kialakítása révén teljes mértékben gátolta annak lefolyását, míg az interfázisos vázat érintetlenül hagyta, mely alapján a 17-dezacetilvinblastinTrp-Arg₈-1 epimer egy ígéretes molekula a rákgyógyászat szempontjából, potenciálisan kisebb mellékhatással bír majd, mint anyamolekulája.

KONKLÚZIÓK

Doktori munkámban: i) jellemeztem két új potenciális rákellenes molekula anti-mikrotubuláris és antimitotikus aktivitását, mely hozzájárulhat a jelenleg használtaknál alacsonyabb mellékhatásokkal bíró gyógyszermolekulák kifejlesztéséhez; ii) feltártam a TPPP/p25 sokrétű szerepét a mikrotubulusok organizációjában és dinamikájában. Mindezek során vizsgáltam a TPPP/p25-öt és a drog molekulákat egyszerű és komplex rendszerekben számos módszert felhasználva: rekombináns, biofizikai és biokémia technikák, “egy-sejt” kísérletek, video- epifluoreszcens- és konfokális mikroszkópia. Mivel a TPPP/p25 expressziója, felhalmozódása és hiánya három különböző neurodegeneratív betegség kialakulásához vezet: oligodendroglioma (TPPP/p25 hiánya az oligodendocitákban), sklerózis multiplex (TPPP/p25 expresziójával összefüggő re- és demyelinizációs problémák) és szinukleinpátia (TPPP/p25 felhalmozódása agyi zárványtestekben), eredményeim hozzájárulhatnak ezen betegségek patomechanizmusának megértéséhez.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

1.) A TPPP/p25 szerepének sejtszintű vizsgálatára létrehoztam három modell rendszert, melyekben a TPPP/p25 expressziója és ennek következményei különbözőképpen vizsgálhatók: i) exogén TPPP/p25 expresszió HeLa sejtekben fluoreszcens fehérjével jelzett humán rekombináns plazmiddal (pEGFP-TPPP/25) történő transzfektálás után ii) szabályozható exogén TPPP/p25 expresszió a doxycyclinnel indukálható CHO sejtvonalból létrehozott CHO10 klón-sejtvonalba; iii) endogén TPPP/p25 expresszió a CG-4 oligodendrocita sejtvonalba. Mindezek megvalósításához a TPPP/p25 cDNS-ét a megfelelő eukarióta expressziós vektorba ligáltam, majd a CHO10 esetében klónszelektációt végeztem.

2.) A TPPP/p25 hatását a mikrotubulus organizációjára és dinamikájára először pEGFP-TPPP/p25-tel transzfektált HeLa sejteken vizsgáltam. α -tubulinra történt immunfestés után a mintákat fluoreszcens mikroszkóppal megfigyelve azt találtam, hogy a TPPP/p25 expressziója elősegíti a mikrotubulusok kötegekbe rendeződését, melyek ezáltal stabilizálódnak és ellenállnak a különböző mikrotubulust depolimerizáló hatásoknak. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a TPPP/p25 szerepet játszik a mikrotubulusok organizációjában és stabilizálásban mikrotubulus kötegelő hatása révén.

3.) Specifikus acetil-tubulin antitestet felhasználva immunofluoreszcens és Western-blot vizsgálatokkal kimutattam, hogy a TPPP/p25 expressziós szintje szorosan összefügg a mikrotubulusok acetilációjának mértékével. A TPPP/p25 és az acetilált tubulin szintje párhuzamosan emelkedik a HeLa és a CHO10 sejtvonalba, míg a TPPP/p25 eltűnése a modell rendszerekből az acetil-tubulin szint csökkenését eredményezi. Megállapítottam, hogy a jelenség hátterében a TPPP/p25 és a HeLa, valamint CHO10 sejtekben kifejeződő, tubulin deacetilálásáért felelős enzim, a Hiszton Deacetiláz 6 (HDAC6) direkt kölcsönhatása állhat, melynek eredményeként a HDAC6 deacetiláz aktivitása csökken. A két fehérje kötődését felületi plazmon rezonancia méréssel igazoltam, míg a HDAC6 aktivitását egy kereskedelmi forgalomban levő kittel mértem. Eredményeim alapján a TPPP/p25 szerepet játszik a mikrotubulusok acetilációs szintjének szabályozásában a HDAC6 gátlása révén.

4.) Korábban azt feltételezték, hogy a mikrotubulusok acetilációja szerepet játszik stabilizálásukban. Ennek igazolására a mikrotubulusok acetilációját a HDAC6 gátlószerének (Trichostatin A) adásával fokoztam HeLa sejtekben, majd immunofluoreszcens mikroszkópiával és Western-blottal megfigyeltem különböző mikrotubulust depolimerizáló ágensek hatékonyságát. Vizsgálataim azt mutatták, hogy a mikrotubulus acetilációja önmagában nem növeli meg a mikrotubulusok stabilitását. Emellett arra is fény derült, hogy a TPPP/p25 mikrotubulus stabilizáló hatása kizárólag kötegelő aktivitásából ered, mikrotubulus acetilációját fokozó hatása ebben nem játszik szerepet.

5.) Élő sejt video mikroszkópos vizsgálat során, az EB3 mikrotubulus plusz vég fehérje mozgási sebességének mérésével kimutattam, hogy a TPPP/p25 befolyásolja a mikrotubulusok növekedési sebességét. A TPPP/p25-tel transzfektált HeLa sejtekben a mikrotubulusok növekedése csökkent. Ugyanezt a jelenséget írták le korábban HDAC6 gátló szerek adása során is, melynek magyarázataként azt feltételezték, hogy a deacetiláz gátlása megnöveli annak mikrotubulus plusz végén töltött idejét, "capping" aktivitása fokozódik, ezáltal a mikrotubulusok növekedése lassul. Megfigyelésem tehát egyrészt igazolja, hogy a TPPP/p25 sejtszinten is gátolja a HDAC6 aktivitását, másrészt megmutatja, hogy a TPPP/p25 stabilizáló hatása mellett a mikrotubulusok növekedési sebességének gátlása révén is befolyásolja a mikrotubulusok dinamikáját.

6.) Kimutattam, hogy az exogén TPPP/p25-öt expresszáló HeLa sejtek mozgása lassul a kontroll sejtekhez képest. Ennek hátterében mindazon TPPP/p25-höz kapcsolható jelenségek állhatnak, melyek a mikrotubulusok dinamikáját csökkentik, mint pl. a megnövekedett stabilitás a mikrotubulusok kötegelése révén, illetve a csökkent mikrotubulus növekedési sebesség. Mindemellett, mivel a tubulin acetilációjának mértéke befolyásolja a motorfehérjék kötődését és aktivitását - így jelentős szerepet tölt be a sejtmozgáshoz szükséges polarizált transzport folyamatokban - a TPPP/p25 a tubulin acetilációját moduláló hatása révén is szerepet játszhat a sejtmozgásban. Ugyanakkor, mivel a tubulin mellett az aktinváz átépülést szabályozó, cortactin is szubsztrátja a HDAC6-nak, nem zárható ki, hogy a TPPP/p25 a HDAC6 gátlása révén az aktin-alapú sejtmozgás szabályozásában is részt vesz.

7.) A mielinhüvelyt kialakító oligodendrociták, melyek az oligodendrocita progenitor sejtekből differenciálódnak az ontogenezis során az egyetlen sejtípus, mely endogénen expresszálja a TPPP/p25-öt. Immunfluoreszcenciával kimutattam, hogy az érett mielinizáló oligodendrociták jelentősen több TPPP/p25-öt expresszálnak mint a progenitor sejtek, valamint, hogy a TPPP/p25 szintjének csökkentése RNS interferencia segítségével megakadályozta az oligodendrociták differenciációját. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a TPPP/p25 szerepe esszenciális az oligodendrocitákban.

8.) Bizonyítottam, hogy az endogén TPPP/p25 szerepet játszik a mikrotubulusok acetilációs szintjének szabályozásában az oligodendrocita sejtekben is. A mikrotubulusok acetiláltságának mértéke és a TPPP/p25 szintje párhuzamosan nő az oligodendrociták differenciációja során, illetve csökken a TPPP/p25 siRNA alapú csendesítése után. Ennek hátterében az oligodendrocitákban előforduló tubulin deacetiláz enzim, a SIRT2, aktivitásának TPPP/p25 általi gátlása állhat. Kimutattam ugyanis, hogy *in vitro* a TPPP/p25 gátolja a SIRT2 deacetiláz aktivitását. Mindezek alapján feltételezzük, hogy a TPPP/p25 a mikrotubulusok acetilációjának szabályozása révén játszik fontos szerepet az oligodendrocitákban, mely poszt-transzlációs módosítás a motorfehérjék aktivitásának modulálása révén befolyásolja a nyúlváynövekedéshez és fenntartáshoz szükséges polarizált transzport folyamatokat. Mindemellett a TPPP/p25 mikrotubulus kötegelő és stabilizáló hatása szükséges lehet ezen transzport folyamatokhoz elengedhetetlen "útvonalak" kialakításához.

9) A KAR-2 mikrotubulus organizációra gyakorolt hatását *in vitro* turbiditásméréssel vizsgáltam. Megállapítottam, hogy a drog koncentráció függő módon gátolja a tubulin polimerizációját mikrotubulussá és a gátlás mértéke megegyezik a vinblasztinnal kapott adatokkal. Ugyanakkor, az *in vivo* humán vastagbél rák eredetű sejtvonalon (Caco-2) történt immunfluoreszcens vizsgálatok során kiderült, hogy bizonyos körülmények között a KAR-2 szelektíven csak a mitotikus sejtek mikrotubulusaira hat, az interfázisos mikrotubuláris vázat nem károsítja. Munkacsoportunk mindemellett a molekula más, vinblasztinnál előnyösebb tulajdonságait is feltárta: a KAR-2-nek nincs anti-calmodulin aktivitása és biohasznosulása is kedvezőbb. Mindezen tulajdonságai révén a KAR-2 egy ígéretes molekula.